

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-309543

(43)Date of publication of application : 07.11.2000

(51)Int.Cl.

A61K 45/00  
A23L 1/30  
A61K 9/08  
A61K 31/00  
A61K 31/22  
A61K 31/235

(21)Application number : 11-121067

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 28.04.1999

(72)Inventor : HAMURO JUNJI  
MURATA YUKIE

## (54) ANTIDIABETIC AGENT

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an antidiabetic agent for curing, improving or prevention of a human diabetes, especially can use even for a shape of a medicinal agent (an infusion formulatin, an oral agent or the like) or a food and drink by a new method capable of oral digesting for improving, curing or prevention of a human immune diseaase and capable of controlling oxidized or reduced state of a macrophage, a monocyte or the like.

SOLUTION: This antidiabetic agent contains a substance having an action determining an amount of an oxidizing type and/or reducing type glutathione in a macrophage cell, examining an amount ratio of an oxidization type to a reduction type of glutathione, classifying the macrophage to an oxidizing type macrophage and a reducing type respectively having different function, analyzing a disease state or degree of various immune diseases in the viewpoint and varying an amount of a reducing type glutathione of the macrophage according to the result. This method can provide an antidiabetic agent enable to be orally digested for curing, improving or prevention of human diabetes and is usable also in a shape of a medicinal agent, a food and drink, a tonic or an infusion formulation.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2000-309543  
(P2000-309543A)

(43)公開日 平成12年11月7日(2000.11.7)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト* (参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	Z 4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/08		A 6 1 K 9/08	4 C 0 8 4
31/00	6 0 3	31/00	6 0 3 N 4 C 2 0 6
	6 3 7		6 3 7

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 20 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平11-121067

(22)出願日 平成11年4月28日(1999.4.28)

(71)出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72)発明者 羽室 淳爾

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社中央研究所内

(72)発明者 村田 幸恵

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社中央研究所内

(74)代理人 100080229

弁理士 石田 康昌 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗糖尿病剤

(57)【要約】

【課題】ヒトの免疫性疾患の改善、治療、予防のための経口摂取が可能で、マクロファージや探求等の酸化、還元状態を制御し得る斬新な方法により、ヒトの糖尿病の治療、改善、予防を目的とした抗糖尿病剤、特に医薬品(輸液製剤、経口剤等)や飲食品の形態でも使用可能な抗糖尿病剤の開発が期待される。

【解決手段】マクロファージ細胞内の酸化型及び/又は還元型グルタチオン量を測定し、酸化型と還元型のグルタチオンの量比を検定することにより、マクロファージをそれぞれ異なった機能を有する酸化型マクロファージと還元型マクロファージとに分類し、種々の免疫性疾患の病態や程度をこの視点で解析し、その結果に基づき、マクロファージの還元型グルタチオン量を変化させる作用を有する物質を含有せしめることにより上記課題を解決するヒトの糖尿病の治療、改善、予防を目的とした経口摂取を可能とする抗糖尿病剤を提供することができ、医薬品や飲食品、栄養剤、輸液製剤の形態でも使用可能である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】マクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を変化させる作用を有する物質を含有することを特徴とする抗糖尿病剤。

【請求項2】当該物質が、当該マクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を増加させることにより炎症性細胞の脾島浸潤を抑制するものである請求項1に記載の抗糖尿病剤。

【請求項3】当該物質が、 $\gamma$ -グルタミルシステイン、 $\gamma$ -グルタミルシステインジメチルエステル及びN-アセチルシステインニトロキシブチルエステル等のグルタチオンの前駆体、グルタチオンモノエステル、グルタチオンニトロキシブチルエステル及びグルタチオンジエステル等のグルタチオン誘導体、リポ酸(LIPOIC ACID)、グリオトキシン及びその誘導体等の、分子内にメルカプト基を2個以上含有する化合物、同化合物を生成する前駆体、オルテン(ORTENE)、並びにフラボノイド及びその誘導体等の抗酸化物質から選択される少なくとも1種を含むものである請求項2に記載の抗糖尿病剤。

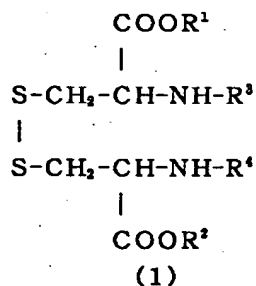
【請求項4】 $\beta(1-3)$ グルカン及びサイトカインから選択される少なくとも1種を含む請求項2及び3何れかに記載の抗糖尿病剤。

【請求項5】当該物質が、マクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を減少させることによりIL-12産生、NO産生、IFN $\gamma$ 産生を抑制し遅延型過敏症反応を抑制するものである請求項1に記載の抗糖尿病剤。

【請求項6】当該物質が、分子内にジスルフィド結合を有する化合物である請求項5に記載の抗糖尿病剤。

【請求項7】当該ジスルフィド結合を有する化合物が下記構造式(1)で示される化合物である請求項6に記載の抗糖尿病剤。

【化1】



但し、上記式中、 $R^1$ 及び $R^2$ はそれぞれ独立して、置換基を有していてもよいアルキル基を、 $R^3$ 及び $R^4$ はそれぞれ独立して、アシル基及びペプチジル基の何れかを、それぞれ表す。

【請求項8】当該置換基を有していてもよいアルキル基が、ニトロキシブチル基である請求項7に記載の抗糖尿病剤。

【請求項9】細胞内の還元型グルタチオン量に差のある酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージの2種

のマクロファージの何れか一方を選択的に除去し得る物質を含有する請求項1に記載の抗糖尿病剤。

【請求項10】当該物質が、細胞毒性を有するDNAアルキル化剤にグルタチオンを共役させた物質又は前駆体としてマクロファージに取り込まれた後に細胞毒性を示す物質である請求項9に記載の抗糖尿病剤。

【請求項11】飲食品、栄養剤及び輸液製剤の何れかの形態にある請求項1～10何れかに記載の抗糖尿病剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規抗糖尿病剤、詳しくはマクロファージ(以下、M $\phi$ と略することもある。)や、単球等の機能の斬新な制御作用を含み、特に、ヒトのインスリン依存性並びに非依存性糖尿病の治療、病態改善、予防を目的とした経口摂取可能な抗糖尿病剤、及びこれを含む医薬品、並びに食品(医療用食品、健康食品、更には特定保健食品等を含む。)、栄養剤及び輸液製剤等の形態にある抗糖尿病剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】免疫系は、ウイルス、細菌等の外部からの感染、又は自己由来細胞が異常を来すことで生成する細胞(癌細胞等)による生体侵襲から自己を防衛するためのシステムである。しかしながら、この免疫系が異常を来し、過剰に働いたり、自己成分を排除する方向に免疫系が働いたりすると共に、逆に、排除機能が不全状態に陥ることがある。このような状態を惹起する疾患は総称して免疫性疾患と呼ばれる。例えばアトピー性皮膚炎、花粉症、喘息、ザルコイドーシス等の急性並びに慢性炎症性疾患、アレルギー性疾患、慢性関節リウマチ、糖尿病(IDDM)、SLE、慢性疲労性症候群(CFS)等の自己免疫疾患や、肝炎、肝硬変、潰瘍性大腸炎、クローン病等炎症性腸疾患(IBD)、癌悪液質状態等数多くの疾患が含まれる。これら免疫性疾患の原因は様々であるが、サイトカイン、炎症性メディエーターの局所での産生を介して、特定の細胞の増殖、分化、壊死を伴う炎症を引き起こすことを発端として全身性の免疫不全、免疫異常、機能不全状態に至る。

【0003】免疫を担当する細胞としてはTリンパ球、Bリンパ球がよく知られ、各々細胞性免疫、液性免疫の担い手として多彩な機能を発揮する。一方、マクロファージ/単球等は細胞性免疫及び液性免疫に深く関与する細胞で、アレルギー、リウマチ等の免疫性疾患、癌、細菌感染等の非自己である異物排除に深く関わっている。マクロファージ/単球等の機能は、分泌機能、抗原呈示を中心とした免疫調節機能、異物、老廃物の処理、食食機能、標的細胞の障害処理機能の4種に大別され、TNF、IL-12、IL-1、IL-6、TGF $\beta$ 、IL-8、IL-18等のサイトカイン、ネオプテリン(NPT)、ジヒドロキシエピアンドロステン(DHEA)等のホルモン様分子、PGE2やLTB4等のアラキド

ン酸代謝産物、C5a、C3等の補体系分子、活性酸素、活性窒素等、炎症像を規定する種々の分子を産生することが知られている。これらの多彩な機能が単一のマクロファージ/単球等によって担われているのか、機能を異にするマクロファージ/単球等集団によって担われているのかは不明であり、リンパ球がその細胞表面マーカーによって分類されその機能との対応が明確になっているのに対し、マクロファージ/単球等の機能の多様性と細胞亜集団の対応については全く不明である。このため、上述のような炎症性、アレルギー性、免疫性疾患の発症と病態進展に、マクロファージ/単球等は極めて重要な役割を有しているにも拘らず、マクロファージ/単球等の細胞亜集団の存在を想定しての機能分類のヒトの疾患の診断、治療、病態改善、予防への応用は全く為されておらず、想定されたことすらなかった。

【0004】近年、アレルギー疾患、慢性関節リウマチ等の自己免疫性疾患や悪性腫瘍患者において、末梢血中のヘルパーT細胞亜集団のタイプの片寄りが疾患と対応づけられつつあり、Tリンパ球中の亜集団であるヘルパーTリンパ球が更に2つの亜集団Th1とTh2に分類され、その2種の存在比が生体の免疫機能の重要な指標になることが立証されつつある。本指標を基に疾患の病態を診断したり、その存在比を改善することにより、より適切な治療法を樹立しようとの試みがなされつつある。即ち、B細胞からのIgE産生を引き起こすTh2がTh1より多い場合(Th1<Th2)、アレルギー性疾患が悪化することが分かってきており、Th1/Th2を測定することにより、免疫の状態を検定したり、Th1>Th2にすることによりアレルギーを抑制しようとする試みがなされつつある。逆に、Th1が支配的な状況で引き起こされる疾患の存在も慢性関節リウマチや慢性期の炎症を始め、次々に指摘されつつある。

【0005】

【本発明が解決しようとする課題】生物材料を用いてTh1とTh2のバランスを測定し、Tリンパ球を標的にこの2つの亜集団の機能を調節しようとしても、局所慢性炎症やアレルギー性疾患の検定、診断に利用することには、現在のところ成功していない。最近、Th1病やTh2病という言葉も用いられるが、必ずしも2者に明確に区別できないのが実態である。

【0006】Th1/Th2の存在比は、リンパ球亜集団の指標でしかなく、リンパ球亜集団の生体内での動態は本発明で取り扱うマクロファージや樹状細胞、クッパー細胞を始めとするアクセソリー細胞と呼ばれる細胞群の機能と実際には複雑に関わっているため、Th1/Th2の存在比だけで疾患の病態を適切に診断し、その情報を基に治療することは困難である。後述するが、マクロファージ/単球等の機能状態によってTh1/Th2のバランスは制御されているのである。治療のためにTh1>Th2に傾斜させることを意図しても、それだけ

では複雑なサイトカインネットワークにおいては効果が得難く、新たな診断、治療のための指標が待ち望まれている。

【0007】炎症反応に深く関与しているマクロファージにおいて、酸化ストレス、サイトカイン刺激、ウイルス、細菌感染等の環境因子により細胞の機能が変化することが判明しているが、その機能とマクロファージの細胞亜集団分類の対応については全く不明である。それら機能、分類において新たな知見が必要であり、それらの知見が得られることにより、飛躍的に有用な新たな治療方法の開発に繋がる。以上の状況下に、免疫を調整する優れた薬剤、即ち免疫調整剤の開発が望まれ、本発明者らはすでにこの考えに沿って新規免疫調整剤を開発した。(特願平9-303426号、特願平10-308300号)。本発明は、これらのマクロファージの機能、分類において得た新たな知見をもとに、特に糖尿病の発生を抑制し、糖尿病の病態を改善する新規な抗糖尿病剤を開発することをその課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、前記課題解決に向けて鋭意検討した結果、次の知見を得た。即ち、炎症の遷延化作用の強いマクロファージ(単球、クッパー細胞及び樹状細胞等を含む)と、免疫調整性のマクロファージとの区別を、マクロファージのレドックス状態(ポテンシャル)の相違から試み、糖尿病自然発症動物において病態の進展とともにマクロファージのレドックス状態が変化することを見出し、課題解決を可能とした。マクロファージのレドックス状態の指標としてはマクロファージ細胞内の還元型グルタチオン(GSH)含量を採用する。

【0009】グルタチオンは、ほ乳類のあらゆる細胞に存在し、内因性の抗酸化物質としてよく知られ、細胞内においてラジカルや過酸化物の除去、プロスタグランジン等のエイコサノイドの代謝、生体異物の解毒、アミノ酸輸送等多様な機能を有しているトリペプチドである。還元型(GSH)と酸化型(GSSG)が存在し、両者間で共役サイクルを形成する。通常の細胞では、GSHの濃度は還元状態の方が圧倒的に多く、酸化ストレス、特にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対して防御的に作用する。

【0010】本発明者等は、マクロファージ中の還元型GSH含量を測定するとともに、GSH含量を異にするマクロファージの免疫機能に及ぼす効果に大きな差のあること、本測定法で生体の免疫能を検定できること、その酸化還元状態を経口投与可能な低分子物質で人為的に調整できること、及び本法が疾患の治療に広範に応用できること、並びに食品として活用できる可能性を見出した(特願平9-303426号、特願平10-308300号)。本概念に基づき、糖尿病自然発症マウスのマクロファージのレドックス状態について鋭意研究を進めた結果、本発明を完成するに至った。

【0011】図1は、本願と同一発明者等による先発明により見出された知見に基づき、マクロファージ又は単球、クッパー細胞及び樹状細胞等（本発明ではこれらを併せてマクロファージと称する）の機能の相違、並びに、Th1及びTh2バランスに及ぼす効果、更にはマクロファージの機能の相違によって引き起こされる免疫抑制、悪液質状態、癌細胞の悪性化誘導の機序、局所炎症等との関係の仮説模式図を示したもので、例えば、担癌進行に従い、局所のTh1/Th2バランスが崩れ、液性免疫に傾き、サイトカインレセプター複合体構成と機能が変化し、GSH含量の少ない酸化型マクロファージが増加し、活性酸素や、PGE2、IL-6、IL-10、IL-8等の炎症伝達因子の産生が高まり、全身性の免疫抑制、悪液質状態となる。

【0012】本発明者等は上記知見に基づき、更に研究を重ねた結果、炎症反応に重要な役割を果たしているマクロファージ細胞中の酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンの含量を検定することにより、不均一なマクロファージ集団が2つのタイプ即ち酸化型マクロファージと還元型マクロファージとに分類することができ、酸化型マクロファージが免疫疾患に伴う局所慢性炎症やアレルギー反応を引き起こし、液性免疫と細胞性免疫のバランスに関与するTh1/Th2バランスはマクロファージの酸化/還元状態によって制御されていること、当該マクロファージの酸化還元状態が免疫性疾患の病態に重要な役割を果たしており当該酸化還元状態を検定し、その状態を人為的に制御、修飾することにより当該疾患の診断及び治療に役立つこと、しかもその制御が経口摂取可能な低分子物質によって簡便に行えることを見出した。

【0013】本発明での酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージの定義は、還元型グルタチオン（GSH）に特異的な化学試薬モノクロロバイメイン（MONOCHLOROBIMANE）と反応させることで細胞内GSH量を定量し、無刺激のマクロファージに比較してGSH含量が増加しているものを還元型マクロファージ、逆に含量の低下しているものを酸化型マクロファージとするものである。更に、経口摂取可能な低分子物質をマクロファージと2～24時間接触させることで、GSH含量が $2\text{nmol}/5 \times 10^5$ マクロファージ細胞以上のものを還元型マクロファージ（又は単球等）、 $0.1\text{nmol}/5 \times 10^5$ マクロファージ細胞以下のものを酸化型マクロファージとすることが好ましい。或いは、無刺激のマクロファージのGSH含量に比較してGSH量が2倍以上になっているものを還元型マクロファージ、1/5以下になっているものを酸化型マクロファージとすることもできる。

【0014】現在、Th1/Th2バランスはIL-6、IL-10若しくはIL-4と、IL-12が生体内でどのような割合で産生されるかによって規定される

とされている。前者によって液性免疫に関与するTh2が、IL-12によってTh1が誘導されることが既に知られている。しかしながら、IL-6、IL-10、IL-12がマクロファージから産生されることは判明しているが、同一のマクロファージ細胞がIL-6もIL-12もすべてIL-10産生すると仮定すると、Th1誘導にもTh2誘導にも関与する1種のマクロファージが存在することとなり、生体の免疫応答を考えるに当り大きな矛盾にぶつかる。

【0015】本発明者等はGSH含量の高い還元型マクロファージによってのみIL-12が産生されTh1誘導に働き、酸化型マクロファージによってはIL-6の産生が亢進し、Th2が誘導されることを見出した。また、Th1サイトカインの代表であるIFN $\gamma$ が産生されてもマクロファージが酸化型に傾斜していると、IFN $\gamma$ の作用でTh2を誘導するIL-6が大量に産生されることも見出された。逆に、還元型マクロファージが存在するとTh1サイトカインの代表であるIFN $\gamma$ によってマクロファージの還元型形質が一層増強されることも判明した。酸化型マクロファージが誘導されているところにTh2サイトカインの代表であるIL-4が作用すると酸化型マクロファージの形質が更に増強される。これらの知見は液性免疫と細胞性免疫という対局にある免疫応答がマクロファージの酸化還元状態によって一義的に規定されていることを示すもので、免疫学の根幹に関わる重要な知見である（図2参照）。この知見により免疫系疾患の病態診断と治療法について、従来の混沌とした免疫性疾患治療法に代わる頗る有用で独創的な発明を既に完成しており、この発明に基づき、糖尿病自然発症動物について鋭意検討した結果、新しく本発明を完成するに至った。

【0016】即ち本発明は、マクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を変化させる作用を有する物質を含有することを特徴とする抗糖尿病剤である。更に本発明には、マクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を増加させることにより炎症性細胞の膵島浸潤を抑制する作用、又はマクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を減少させることによりIL-12産生、NO産生、IFN $\gamma$ 産生を抑制し、遅延型過敏症反応を抑制する作用を有する物質を含有することに特徴を有する抗糖尿病剤も含まれる。本発明においてはマクロファージには単球、クッパー細胞及び樹状細胞等も含められる。本発明者等は前記知見に基づき更に研究を糖尿病に特化し、マクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を減少せたり、増加させる物質を探索し、その効果を発揮する物質を見出し、ヒトの糖尿病に類似する病態を自然発症する動物モデルを作製し、医薬品としての抗糖尿病薬、医療用食品、健康食品、特定保健食品等に用いる糖尿病治療、予防、病態改善効果を有する食品例えば栄養剤及び輸液製剤の開発に研究を深化発展させ、その物質として

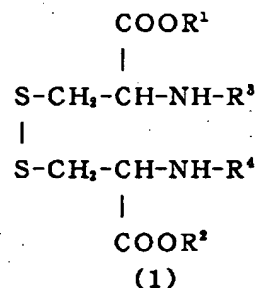
下記の化合物を用いて、試験管内の免疫活性の抑制効果、動物投与下における免疫抑制効果を広く検定し、更には自発的に糖尿病を発症するNOD、db/dbマウスを用いて候補物質の薬効を検討し、マクロファージ及び単球等の細胞内の還元型グルタチオン量を増加させる及び低下させる物質としての下記に示す化合物が糖尿病の治療、予防、病態改善に有効であることを見出した。

【0017】本発明の抗糖尿病剤に含まれる物質としては、一つにマクロファージの細胞内の還元型グルタチオン量を増加させることによりインターロイキン12 (IL-12) の産生を惹起し、炎症性細胞の膵島浸潤を抑制するものが好ましく、例えばγ-グルタミルシステイン、γ-グルタミルシステインジメチルエステル及びN-アセチルシステインニトロキシブチルエステル等のグルタチオンの前駆体、グルタチオンモノエステル、グルタチオンニトロキシブチルエステル及びグルタチオンジエステル等のグルタチオン誘導体、リポ酸 (LIPOIC ACID)、グリオトキシン及びその誘導体等の、分子内にメルカプト基 (SH基) を2個以上含有する化合物、同化合物を生成する前駆体、並びにオルテン (ORTENE) 等から選択される低分子物質がより好ましく、経口投与又は経皮投与が可能である物質が特に好ましい。フラボノイド及びその誘導体等の抗酸化物質のうち、マクロファージと接触させることでGSH含量を上げ、IL-12産生を上げ、IL-6の産生を下げるものを用いることも可能である。また、これらと併用される物質として、例えばβ(1-3)グルカン、サイトカイン等の高分子物質は、静脈内投与、DDS (ドラッグデリバリーシステム) 等を用いての投与において好ましい。当該サイトカインとしては、例えばIL-2、IL-12、IL-18、IFNγ等のサイトカインが好ましく、細胞性免疫を増強したい場合にはIL-2及び/又はIFNγ (インターフェロンγ) が特に好ましい。これらの物質は1又は2以上含有することが可能であり、低分子の経口可能な抗糖尿病剤と高分子の静脈投与に適した免疫調製剤を併用することでより高い効果が期待される。

【0018】また、本発明には、マクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を減少させ、遅延型過敏症反応を抑制し、IL-12、IFNγ産生を抑制する作用を有する化合物も含まれる。好ましくは、このような作用を有する一群の化合物としては分子内にジスルフィド結合 (-S-S-) を有する化合物がよい。本発明にはなかならずジスルフィド結合を有する化合物がシスチン誘導体であり、下記構造式 (1) で示されるものも含まれる。

【0019】

【化2】



【0020】但し、上記式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>はそれぞれ独立して、置換基を有していてもよいアルキル基、好ましくは置換基を有していてもよい炭素数1~12のアルキル基である。特に好ましくは当該置換基がニトロキシ基である。更に好ましくは当該置換基を有していてもよいアルキル基がニトロキシブチル基である。R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>はそれぞれ独立して、アシル基及びペプチジル基の何れかを、それぞれ表す。尚、ペプチジル基はアミノ酸残基又は複数のアミノ酸で構成されるペプチド残基でそのカルボキシル基を介して結合する残基である。又、ニトロキシ基とは、「-ONO<sub>2</sub>」を意味する。

【0021】マクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を増加させ、IL-12産生を増加させることにより炎症性細胞の膵島浸潤を抑制すること、若しくは、並びにマクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を減少させることによりIL-12産生、NO産生、IFNγ産生を抑制する作用を有する物質を実際の患者に適用するにあたっては、患者のマクロファージのレドックス状態を診断することで適切に用いることができる。

【0022】細胞内の還元型グルタチオン量に差のある酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージの2種マクロファージの何れか一方を選択的に除去し得る物質を含有することを特徴とする抗糖尿病剤も本発明に含まれる。当該物質としては、例えば、細胞毒性を有するDNAアルキル化剤をグルタチオンに共役させた物質、酸化型又は還元型マクロファージ特異的抗体とマクロファージに細胞毒性を有する低分子化合物並びにマクロファージに取り込まれた後に細胞毒性を示す物質とを直接又はリンカーを介して結合させた物質等がある。当該アルキル化剤としては、例えばサイクロフォスファミド、ニムスチン (ACNU)、マイトマイシンC、メルファラン等がある。アルキル化剤とグルタチオンとを直接又はリンカーを介して共有結合させることにより、グルタチオンS-トランスフェレーゼ (グルタチオンS-トランスフェラーゼ) 酵素が活性化されている酸化型マクロファージでは、当該酵素の働きによりDNAアルキル化剤が遊離し、酸化型マクロファージを特異的に殺傷することにより除去することができる。また、インビトロでは、殺細胞性が無いものの酸化型又は還元型の何れかのマクロファージ中で増大している酵素の作用により、殺細胞性を示すようになる物質をプロドラッグとして用いることもできる。

【0023】更に、本発明には、前記抗糖尿病薬としての医薬品を含むが、前記、治療、予防、病態改善効果を含有する経口剤の形態にあるもの、食品（医療用食品、健康食品、特定保健食品等を含む。）、栄養剤又は輸液製剤の形態にあるものも含まれる。食品としては、通常の食品や、歯磨きやチューインガム等口の中に運ばれるものも含まれ、特に健康志向の食品に含有されるのが好ましい。また、食品に添加する添加剤の形で用いられてもよい。栄養剤としては、例えばビタミン剤、カルシウム剤等の何れの栄養剤でもよい。輸液製剤の形態としては、例えば高カロリー輸液の形態、生理食塩水により希釈された形態、血液製剤等の通常用いられる輸液製剤に含有された形態を選択することができる。

【0024】更に詳細に述べると、本発明は好ましくは次の通りである。

【0025】ヒトから分離・採取した体液／細胞試料を用いて、マクロファージ細胞内の酸化型及び／又は還元型グルタチオン量を検定することにより、マクロファージをそれぞれ異なった機能を有する酸化型マクロファージと還元型マクロファージとに分類し、その存在割合を経口摂取できる物質で人為的に制御したり、片方の（酸化型若しくは還元型の）マクロファージを人為的に除去することで糖尿病患者治療に有用な薬剤や病態改善、予防に役に立つ食品、栄養剤、輸液を提供することである。ヒトからの分離・採取した体液／細胞試料とは、例えば末梢血や腹腔、胸腔、各種臓器より分離した細胞である。

【0026】グルタチオンの測定方法としては、直接的に酵素リサイクリング法で生化学的に酸化型又は還元型グルタチオン含量を測定する（活性酵素実験プロトコル（細胞工学分冊）、秀潤社、頁84-88、1994年、ANALYTICAL CHEMISTRY, VOL. 106, PP207-212, 1980; CELLULAR IMMUNOLOGY, VOL. 164, PP73-80, 1995等参照。）のみならず、間接的な測定、例えば酸化型又は還元型マクロファージに対する特異的なモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いて測定したり、モノクローバイメインのようにGSHに特異的に反応し、錯体を形成し、レーザー光励起により蛍光を発するような試薬を用いればよい。更には高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、ガスクロマトグラフィーを用いることも可能である。

【0027】

【発明の実施の形態】本発明の実施の形態を更に詳しく説明する。

【0028】本発明におけるグルタチオンとは、別名5- $\gamma$ -L-グルタミル-L-システニルグリシンであり、生体内に最も多く存在する、メルカプト基（SH基）を有する化合物で、一般にGSHと記述される。グルタチオンは、その分子の酸化状態により還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンに分類される。還元型グルタチオンとは、前記のグルタチオン（GSH）のことであり、

酸化型グルタチオンは、別名グルタチオンジスルフィドと呼ばれるもので、GSSGと記述される。

【0029】本発明におけるマクロファージには、前述の通り単球も含まれる。同時に、樹状細胞やクッパー細胞と呼ばれるマクロファージの類縁細胞も含まれる。マクロファージは、様々なサイトカインや炎症性メディエーター等の情報伝達物質をその細胞から遊離、放出することが知られているが、その活性化状態、分化状態により、放出されるか否か、また、放出される量が異なる。本発明によれば、例えばマクロファージ細胞内の酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンとの量に着目し、酸化型マクロファージと還元型マクロファージに分類後、生体の免疫状態を確認して、本発明の抗糖尿病剤等により、これらマクロファージの酸化還元状態のバランスを調整することにより、生体内の免疫状態や肝機能、糖代謝を改善し、インスリン依存性、非依存性糖尿病疾患の治療、病態改善や予防に役立てられる。

【0030】還元型マクロファージでは、細胞内の還元型グルタチオンが酸化型マクロファージより相対的に多いのに対して、酸化型マクロファージでは、還元型グルタチオンが還元型マクロファージより相対的に少ない。また、還元型マクロファージと酸化型マクロファージでは、還元型GSH含量の違いのために転写制御因子の活性化に違いが生じ、サイトカインや炎症伝達因子の遺伝子発現に違いが起こり、産生される炎症性サイトカインや炎症性メディエーターの種類や量が変化し、炎症の質が変化する。

【0031】酸化型マクロファージでは、IL-6、IL-1、IL-8、IL-10、TNF、過酸化水素、スーパーオキシド、PGE2等の炎症性サイトカイン及びメディエーターが産生されるのに対して、還元型マクロファージでは、一酸化窒素（NO）、IL-12、LTB4等が産生される。更に、酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージは、刺激等により変換する。例えば、炎症や敗血症性ショックを誘導するLPSやPMAや、IL-4、TGF $\beta$ 等のサイトカインにより人為的に刺激することにより、還元型マクロファージは酸化型に変換され、逆に、IFN $\gamma$ 、IL-2、抗腫瘍性多糖であるレンチナン（LNT）等の $\beta$ （1-3）グルカンやリボ酸等の抗酸化剤を添加することにより、酸化型マクロファージを還元型に変換することができる。このことにより、糖尿病疾患の治療に応用することができる。

【0032】インスリン依存性糖尿病病態動物においては、早期に炎症性細胞の膵島浸潤が起こり、これら炎症性細胞の産生するメディエーターの作用により抗原特異的な免疫応答ななく細胞性免疫が活性化され後期に活性化された細胞性免疫を介して膵島のランゲルハンス島が破壊されてインスリンの分泌不全に至り、糖尿病を発症すると推定されている。発症にいたるまでの病態変化に伴い、酸化型マクロファージ及び還元型マクロファ



ージの含まれる量が異なることが本発明において初めて見出された。

【0033】他の疾患においても病態によって酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージの含まれる量が異なることを本発明者らは見出している。消化管炎症疾患モデル動物（肝炎、クローン病、潰瘍性大腸炎）より採取したマクロファージ中の還元型グルタチオン量は、正常動物より相対的に減少していることが、Adherent cell analyzing system (ACAS) を用いる画像解析や酵素リサイクリング法を用いる生化学的定量により判明した。これに対して、糖尿病を自然発症するNODマウスにおいてはマクロファージ等の炎症性細胞の脾臓浸潤時期には腹腔内マクロファージ中の還元型グルタチオン量は、正常動物より相対的に減少しており（酸化型マクロファージ優位）、ランゲルハンス島破壊による糖尿病発症時期には、逆に腹腔内マクロファージ中の還元型グルタチオン量は、正常動物より相対的に増加して（還元型マクロファージ優位）いることが本発明において初めて判明した。このことはインスリン依存性の糖尿病においてはマクロファージのレドックス機能は酸化型への傾斜から、還元型への傾斜へと病態の進展とともにスイッチのおこることを示す。この知見は世界で始めてのものであり、免疫性疾患としてのインスリン依存性糖尿病の治療、予防、病態改善の手段としてマクロファージ中の還元型グルタチオン量を修飾することが実際に有益であることを初めて見出したものである。なかんずく、病態の変化に対応して適切な治療手段を提供することをはじめて可能とした。本発明になるこの知見を無視して治療を行うことは逆に病態を悪化させる危険性をも示唆する重要な知見である。

【0034】本発明に従えば、好ましくはマクロファージの細胞内の還元型グルタチオン量を上記方法で測定した後に、当該マクロファージの細胞内の還元型グルタチオン量を変化させる作用を有する低分子化合物で経口摂取でも活性が保持されるものを医薬品として通常の製剤化を行い、病態をモニターしつつ連日若しくは一定の期間をあげ患者に摂取させればよい。

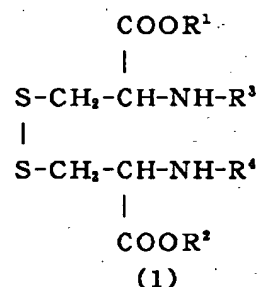
【0035】本発明での酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージの定義は、還元型グルタチオン（GSH）に特異的な化学試薬モノクロロバイメインと反応させることで細胞内GSH量を定量し、無刺激のマクロファージと比較してGSH含量が増加しているものを還元型マクロファージ、逆に含量の低下しているものを酸化型マクロファージとするものである。更に、経口摂取可能な低分子物質をマクロファージと2～24時間接触させることで、GSH含量が $2\text{ nmol es} / 5 \times 10^5$ マクロファージ細胞以上のものを還元型マクロファージ、 $0.1\text{ nmol es} / 5 \times 10^5$ になっているものを還元型マクロファージ、 $1/5$ 以下になっているものを酸化型マクロファージとすることもできる。

【0036】マクロファージの細胞内の還元型グルタチオン量を増加させる作用を有する物質としては、マクロファージの細胞内の還元型グルタチオン量を増加させることによりインターロイキン12の産生を惹起し、炎症性細胞の脾臓浸潤を抑制するものが好ましく、例えば、 $\gamma$ -グルタミルシステイン、 $\gamma$ -グルタミルシステインジメチルエステル、N-アセチルシステインニトロキシブチルエステル等のグルタチオンの前駆体、グルタチオンモノエステル、グルタチオンニトロキシブチルエステル及びグルタチオンジエステル等のグルタチオン誘導体、リポ酸（LIPOIC ACID）、グリオトキシン及びその誘導体等の、当該分子内にメルカプト基を2個以上含有する化合物、同化合物を生成する前駆体、並びにオルテン（ORTENE）から選択される低分子物質がより好ましく、経口投与又は経皮投与が可能である。フラボノイド及びその誘導体等の抗酸化物質のうち、マクロファージと接触させることでGSH含量を上げ、IL-12産生を上げ、IL-6の産生を下げるものを用いることも可能である。

【0037】マクロファージ内のGSH量を減少させるものとしては、好ましくは分子内にジスルフィド結合を有する化合物で、マクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を減少させ、遅延型過敏症反応を抑制しIL-12、IFN $\gamma$ 産生を抑制する作用を有する化合物が用いられる。グルタチオン誘導体もこの中に含まれる。なかんずくジスルフィド結合を有する化合物が好ましくはシスチン誘導体であり、更に好ましくは下記構造式（1）で示されるものを用いることができる。

【0038】

【化3】



【0039】但し、上記式中、 $R^1$ 及び $R^2$ はそれぞれ独立して、置換基を有していてもよいアルキル基、 $R^3$ 及び $R^4$ はそれぞれ独立して、アシル基及びペプチル基の何れかを、それぞれ表す。

【0040】以下に、特に本発明の抗糖尿病剤としてシスチン誘導体を使用する場合について説明する。還元型グルタチオン量を減少させる作用を有する物質については、好ましくは前記の通りジスルフィド結合を含有する化合物群より選択され、IL-12産生、NO産生、IFN $\gamma$ 産生を抑制し、遅延型過敏症反応を抑制する作用を有する物質を本発明においては用いることができるのであり、前記構造式（1）に示され、マクロファージ細

胞内の還元型グルタチオン量を減少させ、遅延型過敏症反応を抑制し、IL-12、IFN $\gamma$ 、NO産生を抑制する作用を有する化合物であれば全て本発明に使用するシスチン誘導体に含まれる。

【0041】この化合物の骨子としては、ジスルフィド結合によりマクロファージ細胞内の還元型グルタチオンが酸化されて酸化型マクロファージに誘導されるものであれば、式(1)において、R<sup>1</sup>からR<sup>4</sup>を表す置換基には、広範な範囲のものが許容される。好ましくはR<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>はそれぞれ独立して、置換基を有していてもよい炭素数1-12のアルキル基、更に好ましくはニトロキシブチル基等の置換基を有するアルキル基を、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>はそれぞれ独立して、好ましくは炭素数1-12のアシル基、及びペプチジル基の何れかを、それぞれ表す。

【0042】シスチン誘導体として、N, N'-ジアセチルシスチン((NAC)<sub>2</sub>)、N, N'-ジプロピルシスチン((NPC)<sub>2</sub>)、N, N'-ジアセチルシスチンジメチルエステル((NAC-OMe)<sub>2</sub>)、N, N'-ジアセチルシスチンジイソプロピルエステル((NAC-OiPr)<sub>2</sub>)、N, N'-ジ-L-アラニルシスチンジメチルエステル((NAlaC-OMe)<sub>2</sub>)、これらのニトロキシブチルエステル体等が好ましい。

【0043】マクロファージ(又は単球等)を96穴マイクロプレートで、5×10<sup>5</sup>細胞/200 $\mu$ l/穴培養し、被験物質を0.01 $\mu$ M~5mM添加し、37℃で5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養し、2~24時間後に対照群に対し還元型GSH量を増加又は減少させるものならば何れも用いることができる。2nmol/5×10<sup>5</sup>マクロファージ細胞以上に増加させる物質又は0.1nmol/5×10<sup>5</sup>マクロファージ細胞以下に減少させることもできるものが望ましい。これらの薬剤は単独若しくはそれらの混合物として用いることができる。その効果は摂取若しくは投与後炎症局所や末梢血から単核球を採取し、前述の方法で細胞内還元型グルタチオン量の治療前に対する変化を検定することで判定できる。このことで抗糖尿病剤としての有用性は明確に判定され、疾患に対して効果を有する。

【0044】対象として用いることのできる疾患としては、インスリン依存性、非依存性糖尿病やそのハイリスクの健康状態を上げることができる。

【0045】本発明で取扱う抗糖尿病剤は実際の医療現場では単独で投与することもできるが、本発明に含まれる経口摂取可能な抗糖尿病剤同士、若しくは、経口摂取不可能であるが異なる作用機転でマクロファージの細胞内の還元型グルタチオン量を変化させる他の免疫調整剤、例えばレンチナンを代表とする $\beta$ (1-3)グルカンや、インターロイキン2(IL-2)を代表とするサイトカイン等生体外由来並びに生体内由来の物質と混合若しくは併用することもできる。特に、細胞性免疫を増

強したい場合にはIL-2と併用したり、インターフェロン $\gamma$ (IFN $\gamma$ )と併用すると還元型マクロファージより大量にインターロイキン12(IL-12)が生体内で産生され本発明の効果を一層増強する。逆に、細胞性免疫を減弱することで治療効果を意図する場合にはインターロイキン4(IL-4)やTGF $\beta$ (形質転換増殖因子 $\beta$ )と併用するとIL-12の産生が減弱し効果を増強する。これらサイトカインはそれ自身がマクロファージの細胞内の還元型グルタチオン量を変化させることも本発明者らにより見出され、本発明の有用性とその範囲を補強するものである。生体外由来の物質としては抗体以外にもIL-12の産生や機能を阻害する物質であれば併用することにより更なる相乗効果が期待される。

【0046】細胞内の還元型グルタチオン量に差のある、即ち、還元型GSH含量の低いマクロファージ(酸化型マクロファージ)、若しくは高いマクロファージ(還元型マクロファージ)の何れか一方を選択的に除去する物質を使用することも本発明に含まれる。その際に用いられる物質は低分子化合物、高分子化合物の何れでもよく、中でも抗体及びその誘導体は効率的である。

【0047】既に述べた通り、マクロファージ/単球等の機能の多様性と細胞亜集団の対応については今まで全く不明であった。このため、炎症性、アレルギー性、免疫性疾患の発症と病態進展に、マクロファージ/単球等は極めて重要な役割を有しているにも拘らず、マクロファージ/単球等細胞亜集団の存在を想定しての機能分類のヒトの疾患の治療、改善、予防への応用は全く為されておらず、想定されたことすら無かった。本発明完成の前段階として、マクロファージの還元型GSH含量を測定するとともに、世界で始めて、GSH含量を異にするマクロファージの免疫機能に及ぼす効果に大きな差のあることを見出し、炎症反応に重要な役割を果たしているマクロファージ細胞中の酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンの含量を検定することにより、不均一なマクロファージ集団が2つのタイプ即ち酸化型マクロファージと還元型マクロファージとに分類され、酸化型マクロファージが免疫疾患に伴う局所慢性炎症やアレルギー反応を引き起こし、液性免疫と細胞性免疫のバランスに関与するTh1/Th2バランスはマクロファージの酸化/還元状態によって制御されていること、当該マクロファージの酸化還元状態が免疫性疾患の病態に重要な役割を果たしていることが見出された。この2種のマクロファージの存在割合を人為的に制御するには前述の化合物、好ましくは経口摂取可能な低分子物質を医薬品として用いる以外に、何れか片方のマクロファージを選択的に除去することも頗る有用な方法である。このことはリンパ球に対する各種モノクローナル抗体が免疫抑制剤として上市されている事実からも明らかである。片方のマクロファージにのみ若しくは多量に発現されているマ-

カーに対する抗体を用いればよいことは当業者には容易に想定できるところである。

【0048】また、細胞に対して毒性を有する物質やその誘導体を用いることができるが、還元型マクロファージと酸化型マクロファージの間には細胞内の各種酵素活性に大きな違いがあるのでプロドラッグの形のもので還元型マクロファージ若しくは酸化型マクロファージの何れかの細胞内で選択的に細胞毒性を有する物質に変換できるもの等は、本発明に最も叶う。酸化型マクロファージ内で活性が上昇するピリミジンヌクレオチドホスホリレース（ピリミジンヌクレオチドホスホリラーゼ）酵素活性やグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）酵素活性の活用等がその例であり、細胞毒性を有するアルキル化剤にグルタチオンを共役させたもの等がある。

【0049】本発明の抗糖尿病剤が糖尿病性疾患及び同疾患に伴う合併症に広く適用できることは、マクロファージからの炎症性伝達因子の分泌を基本的なところで制御することから明白である。例えば、非ステロイド性酸性抗炎症剤（アスピリン等）は、プロスタグランジン産生、遊離を抑制することでその薬効を発揮するといわれる。一方、ビタミンE等の抗酸化剤は活性酸素の産生を抑制することで薬効を発揮する等、その作用が図1に示す炎症性細胞たるマクロファージの多彩な機能の1局面を制御するのみである。そのため、その効果も著明ではなく、特に慢性炎症には効果は殆ど認められない。それに対して本発明になる抗糖尿病剤はマクロファージの酸化/還元状態を制御することを基本とするもので、有害な炎症伝達因子の産生を一度に多数抑制できるものである。従来の糖尿病治療剤の概念を基本から変革するものといえる。

【0050】以上のように、本発明の抗糖尿病剤の医療現場における有用な薬効は、その有用な免疫薬理活性からして自明であり、疾患の急性期、慢性期の何れにも、また糖尿病疾患に随伴する合併症の予防、治療、病態改善にも有用である。

【0051】これらの薬剤は単独若しくはそれらの混合物として用いることができる。その効果は摂取若しくは投与後炎症局所や末梢血から単核球を採取し、前述の方法で細胞内還元型グルタチオン量の治療前に対する変化を検定し、生体の免疫活性の変動を測定することで判定できる。

【0052】本発明の抗糖尿病剤の投与形態としては、注射投与、経口投与、経皮的投与等特に制限はないが、経口投与が好ましい。有効成分である還元型グルタチオン量を変化させる作用を有する物質の投与量は、患者等投与対象者の症状や使用目的に応じて選択されるが、1日当たり1mg～5000mg（経口剤）程度、好ましくは10～500mg程度である。製剤を製造する場合は特に困難はなく、経口剤、注射剤、経皮剤等所望の剤

型において、それぞれ公知の方法を利用して製造することができる。

【0053】以上、本発明になる抗糖尿病剤が狭義の医薬品として如何に有用で、新規性に優れるかを説明した。本発明において、抗糖尿病剤は経口摂取可能な物質をその主要成分とした場合には、その用途は、医療現場における医薬品に限られない。即ち、ヒトマクロファージ（単球、クッパー細胞及び樹状細胞等を含む）細胞内の還元型グルタチオン量を変化させる作用を有する物質を単独若しくは混合物として含有する医療用食品、健康食品、特定保健食品等として食品（チューインガムや歯磨き等の口に入れるものは全て含まれる）並びに、栄養剤、輸液製剤の形態で提供することも可能であり、本発明に含まれる。医療用食品等は固形物であっても、液体であってもよくその形態を問わない。

【0054】適用対象としては医薬品として提供する場合と同じである。糖尿病性疾患及び同疾患に伴う合併症に広く適用でき、抗糖尿病作用を有する経口剤、食品例えば栄養剤の形態、輸液製剤の形態で提供することのできるものである。有効成分の使用量については、前記医薬品の場合に説明した内容に準じて行うとよい。発症、慢性化した糖尿病疾患だけでなく、糖尿病のハイリスクの人に予防的に摂取させることを可能にする。

【0055】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

【0056】（実施例1）

<酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージの機能の検定>

（方法）酸化型マクロファージは、LPS（リボポリサッカライド）20 $\mu$ gをマウス腹腔内に投与して誘導されること、還元型マクロファージはレンチナン100 $\mu$ gを同じく腹腔内に1日おきに3回投与することにより誘導されていることが、腹腔浸出細胞をプラスチック表面に付着させた後、モノクロロバイメイン10 $\mu$ Mと37 $^{\circ}$ C、30分間反応させ、ACASで解析することで判明した。酸化型の増量は反応産物が殆ど認められないこと、即ちネズミ色や青色の画像になること、還元型の増量は赤色や黄色の画像が得られることから肉眼的に容易に検定できる。

【0057】そこで、腹腔浸出付着細胞を以下のようにして酸化型及び還元型に誘導して産生されるNO、IL-6、PGE2を測定した。

【0058】（1）材料

細胞：上記のように刺激して得られた腹腔浸出付着細胞、即ちマクロファージを96穴マイクロプレートに1 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/200 $\mu$ l宛添加。

培地：フェノールレッドフリーのRPMI1640：200 $\mu$ l/穴。

LPS:リボポリサッカライド(シグマ社製)(由来:  
E. coli)100ng/ml。

IFN $\gamma$ :100単位/ml。

【0059】(2)培養方法

5% CO<sub>2</sub>インキュベーター中37℃で、48時間培養。

【0060】(3)測定方法

上記培養終了後、培養上清を回収し、IL-6はIL-6依存性の細胞株のMH60を用いて増殖反応で、PGE2はエライザキットを用いて、NOはグリースロイミン試薬を用いて、何れも当業者が日常に行う方法で各々の産生量を測定した。

【0061】(結果)結果を図3に示した。図3から明らかなように、酸化型マクロファージと還元型マクロファージとでは、産生する炎症性サイトカインIL-6、炎症性メディエーターPGE2、NOの産生強度、種類が異なることが明らかである。即ち、酸化型マクロファージではTh2サイトカインであるIL-6の産生と免疫抑制性でTh1誘導を抑制するPGE2産生が上昇し、NO産生は低下する。これとは対照的に還元型マクロファージからはNOの産生が上昇し、PGE2産生やIL-6産生は抑制される。両マクロファージの間に機能的な差異が存在することが明確である。

【0062】(実施例2)

<糖尿病自然発症NODマウス病態動物を用いた検定>  
酸化型M $\phi$ と還元型M $\phi$ において、何故炎症メディエーターやサイトカインの産生に違いが生じるのかを物質レベルで解析することは、炎症の慢性化、増悪のメカニズムを解明するために重要である。一般に、外からの刺激(リガンド等)は、細胞表面上に存在する受容体(レセプター)を介して細胞内に伝達する。レセプターからの信号により、種々のキナーゼが活性化され、更に転写因子が活性化され、転写因子が核内に移行し、標的となる遺伝子に結合して発現する。最近の研究により、細胞内の酸化還元系は、転写因子の活性化、核内への移行、遺伝子との結合に関与していることが明らかとなりつつある(ANNUAL REV. IMMUNOLOGY, VOL.8, PP453-475,1990, EMBO J.,10,2247-2251,1991)。M $\phi$ における炎症メディエーターやサイトカインのレセプターを介した遺伝子発現系に、細胞内の酸化還元系がどのように関与しているかは現在のところ明らかではない。

【0063】(サイトカイン、刺激剤)マウスIFN $\gamma$ には、ゲンザイム社製のリコンビナント体を用いた。ヒトIL-2及びヒトIL-6には、味の素社製のリコンビナント体を用いた。ヒトIL-12には、ファーマシン社製のリコンビナント体を用いた。

【0064】LPSには、ディフコ社製のE. Coli. 055:B5由来のものを用いた。レンチナンとしては、味の素社で製造した製剤品を用いた。

【0065】(使用したマウス)インスリン依存性糖尿

病病態動物としてのNODマウスは日本クレアより購入し、主として雌マウスを実験に供した。対照として用いた野生型マウスは、日本チャールスリバー(CRJ)より購入したICRマウスを用いた。インスリン非依存性糖尿病病態動物としては日本クレアより購入したdb/dbマウスを用いた。

【0066】(腹腔M $\phi$ の採取)腹腔細胞の採取は、エーテルにより犠牲死させたマウスの腹腔内に、氷冷した5mlのフェノールレッドフリーのDMEM培地(日研生物社製)を22ゲージの針を付けた注射筒により注入し、しごいた後、培地を抜き取るにより行った。

【0067】(IL-6の定量)1 $\times$ 10<sup>6</sup>個のM $\phi$ に刺激剤を添加し、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターにて2日間培養した。遠心後培養上清を採取した。

【0068】IL-6の定量は、IL-6に依存的に増殖するマウスハイブリドーマMH60細胞を用いて行った(EUR.J. IMMUNOL., VOL. 18, PP 951, 1988)。10% FCS含有RPMI培地で1 $\times$ 10<sup>5</sup>個/mlに調製したMH60細胞液100 $\mu$ lに、培養上清100 $\mu$ lを添加し、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターにて、2日間培養した。その後、同培地にて5mg/mlの濃度に調製したMTT(シグマ社製)を10 $\mu$ l加え、37℃にて5時間反応させた。反応終了後遠心し、上清を160 $\mu$ l取り除き、塩酸-プロパノールを100 $\mu$ l加えて、ピベットマンで懸濁することにより細胞を溶解した。溶解後直ちに570nmの吸光度をイムノメーター(バイオラッド社製)により測定した。

【0069】(NO<sub>2</sub>-濃度の測定)1 $\times$ 10<sup>6</sup>個のM $\phi$ に刺激剤を添加し、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターにて2日間培養した。遠心後培養上清を採取した。

【0070】100 $\mu$ lの培養上清に、50mg/mlの濃度に蒸留水で調製したグリースロイミン試薬(和光純薬社製)を100 $\mu$ l加えて室温で15分間反応させた。反応終了後、540nmの吸光度を測定した。尚、スタンダードとして、NaNO<sub>2</sub>を用いた。

【0071】(ACASによる細胞内GSHの検出)Chambered coverglass(Nunc社製、#136439)に、RPMI1640培地(フェノールレッドフリー)にて調製した3 $\times$ 10<sup>5</sup>個/mlの細胞懸濁液を300 $\mu$ l入れ、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターにて2時間培養した。同培地にて洗浄後、同培地にて調製した10 $\mu$ Mのモノクロロバイメイン(Molecular probe社製)を300 $\mu$ l添加し、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターに入れ、30分反応させた後、ACASにて蛍光強度を測定した。尚、ACASではUVレーザーを用いた。

【0072】(IL-12の定量)IL-12定量は、ヒトT細胞株2D6細胞を用いたバイオアッセイで行った(J. LEUKOCYTE BIOLOGY, VOL 61, PP346, 1997)。

【0073】500pg/mlのリコンビナントヒトI

IL-12、50 $\mu$ Mの2-メルカプトエタノール、10%FCS(牛胎児血清)を含むRPMI 1640培地に培養しておいた2D6細胞をチューブに移し、IL-12を除いた同培地に3回遠心洗浄し、細胞濃度を $1 \times 10^5$ /mlに調製した。予め50 $\mu$ Mの2-メルカプトエタノール、10%FCSを含むRPMI 1640培地により系列希釈したサンプルを100 $\mu$ lづつ入れた96穴平底プレートに、細胞懸濁液を100 $\mu$ lづつ加えた。その後、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターに入れ、48時間培養した。最後の6時間で、3H-TdRをパルスした(50 $\mu$ Mの2-メルカプトエタノール、10%FCSを含むRPMI 1640培地により、370kBq/mlに調製したものを50 $\mu$ lづつ添加)。細胞をハーベストし、 $\beta$ カウンター(マトリックス96;バックード社製)で放射活性を測定した。

【0074】(NODマウスより調製したM $\phi$ のGSH濃度の測定) 前述の方法で腹腔細胞を調製し、MCB試薬を用いたACASにより、細胞内GSH量を解析した。対照のマウスに比べ、3-5週令のNODマウスにおいては、還元型グルタチオンの量は著明に減少し、発症マウスにおいては逆に著明に増大した。

【0075】(NODマウスより調製したM $\phi$ の機能) 野生型マウスと、NODマウスより腹腔細胞を調製し、LPS、IL-2、IFN $\gamma$ 及びその組み合わせにより刺激し、NO産生及びIL-12産生能を測定した。IL-12産生に関しては、無刺激では何れのマウスでも殆ど産生がみられないが、LPSとIFN $\gamma$ 刺激の組み合わせにおいて、3-5週令のNODマウスにおいては、産生は認められず、発症マウスにおいては産生が認められた。NO産生は3-5週令のNODマウスにおいては、対照の3-4分の1に低下し、発症マウスにおいては逆に対照の2-3倍に産生量は増大した。このことは、ここに用いたNOD病態動物は炎症性細胞の脾臓浸潤時期には酸化型マクロファージが優位でTh2主流の液性免疫が亢進し、Th1によって担われる細胞性免疫が低下していることを示す。一方、ランゲルハンス島の破壊による糖尿病発症、インスリン分泌不全状態の時期には還元型マクロファージが優位でTh1主流の細胞性免疫が亢進し、Th2によって担われる液性免疫が低下していることを示す。病態動物モデルにおいても、本発明の抗糖尿病剤提供や適用に必要な疾患の病態診断が独創的で、有意義であることを明確に示す例である。

#### 【0076】(実施例3)

<NODマウスにおける還元型グルタチオン測定による検定>

(方法) NODマウス及び対照マウスの腹腔から採取したマクロファージの酸化型及び還元型の検定を行った。マウスに生理食塩水5mlを腹腔内注射し、腹腔内マクロファージを採取し $3 \times 10^6$ 個/mlになるように10%牛胎児血清含有フェノールレッドフリーのRPM

I 1640培地に懸濁し、100 $\mu$ l宛Lab-Tek Chamber Slide (NUNC社製、#136439)に添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下、3時間培養し、浮遊細胞を除去した後、血清非含有の上記培地を200 $\mu$ l添加し、次いでモノクロロバイメイン(MONOCHLOROBIMANE=MCB)を10 $\mu$ Mになるように添加し、30分間反応させ、ACAS装置(MERIDIEN社製)にてUV吸収を基に画像解析した。

【0077】(結果) ACAS法により、還元型グルタチオンを定量した結果、対照マウスに比べ、3-5週令のNODマウスにおいては、還元型グルタチオン含量が減少したマクロファージ、即ち酸化型マクロファージが相対的に増量した。酸化型マクロファージが増量しているため、上記マクロファージ培養上清中のIL-6が著明に増量していた(対照マウスの120pg/mlに対して、430pg/ml)。発症マウスにおいては還元型グルタチオン含量が増加したマクロファージ、即ち還元型マクロファージが相対的に増量した。数多くのパラメーターを測定しなくてもマクロファージの酸化還元状態をグルタチオンの含量を測定することで糖尿病患者の病態、免疫機能診断等のための検定を簡便且つ的確に行うことができることを示す。このことにより、本発明の抗糖尿病剤の使用に当たり、以上のマクロファージ分類方法により、糖尿病患者の病態、免疫機能診断等のための検定を行うことができる。

#### 【0078】(実施例4)

<3-5週令NODマウスへの薬剤投与による還元型マクロファージの誘導> 4週令のNODマウスに、毎日1mg/0.5ml/hのグルタチオンエチルエステルを1日おきにゾンデを用いて5回経口投与した。そのマウスより実施例3と同様の方法で腹腔内細胞を採取し、腹腔内マクロファージを採取し $3 \times 10^6$ 個/mlになるように10%牛胎児血清含有フェノールレッドフリーのRPMI 1640培地に懸濁し、100 $\mu$ l宛Lab-Tek Chamber Slide (NUNC社製、#136439)に添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下、3時間培養し、浮遊細胞を除去した後、血清非含有の上記培地を200 $\mu$ l添加し、次いでモノクロロバイメインを10 $\mu$ Mになるように添加し、30分間反応させ、ACAS装置(MERIDIEN社製)にてUV吸収を基に画像解析した。

【0079】(結果) ACAS法により、還元型グルタチオンを定量した結果、対照生理食塩水投与群NODマウスに比べ、グルタチオンエチルエステル投与のNODマウスでは、還元型グルタチオン含量が減少したマクロファージ、即ち酸化型マクロファージが相対的に減量した。還元型マクロファージが増量しているため、上記マクロファージ培養上清中のIL-6が著明に減量していた(対照マウスの3800pg/mlに対して、460

pg/ml)。マクロファージのレドックス状態がグルタチオンエチルエステルの経口投与で改善できることが判明した。同様の作用は $\gamma$ -グルタミルシステインジメチルエステルの腹腔内投与(2mg/0.5ml/匹、4週令より1日おき5回投与)、N-アセチルシステインニトロキシブチルエステルの腹腔内(0.5mg/0.5ml/匹、4週令より1日おき5回投与)、経口投与(1mg/0.5ml/匹、4週令より1日おき5回投与)、グルタチオンモノエチルエステル(2mg/0.5ml/匹、4週令より1日おき5回投与、腹腔内、経口)、グルタチオンニトロキシブチルエステル0.5mg/0.5ml/匹、4週令より1日おき5回投与、腹腔内、経口)及びグルタチオンジエチルエステル(2mg/0.5ml/匹、3週令より1日おき6回投与、腹腔内、経口)の経口、腹腔内投与、リポ酸(LIPOIC ACID)の腹腔内投与(4mg/0.5ml/匹、4週令より1日おき5回投与)でも認められた。

#### 【0080】(実施例5)

<ザルコイドーシス疾患患者から採取したマクロファージの検定とその酸化状態の還元状態への変換>ザルコイドーシス(類肉腫症)の疾患の患者の末梢血及び胸腔内より常法により分離・採取した単核球中に含まれるマクロファージの酸化型及び還元型マクロファージの量を酵素リサイクリング法により、還元型グルタチオン(GSH)及び酸化型グルタチオン(GSSG)の量を生化学的に測定することにより検定を行った。対照としては健康人の末梢血を用いた。

【0081】(材料)健康人の末梢血及びザルコイドーシス患者の末梢血をヘパリン採血或は患者の気管支に経気管支鏡(BRONCHOFIBER)的に150mlの生理食塩水を注入し、75mlを回収して、何れもフィコールハイベーク(LYMPHOPREP)で分離精製した単核球を10%牛胎児血清含有RPMI1640倍地に懸濁し、3回洗浄後、ガラスシャーレに30分間付着させたマクロファージ/単核球画分を用いた。この後、5mMのN-アセチルシステイン(NAC)を添加して3時間培養する群及び培地成分のみの群を調製した。シャーレからの分離にはラバーポリースマンを用いた。5×10<sup>6</sup>個のマクロファージについて以下のよう

に検定を実施した。

【0082】(方法)還元型と酸化型のグルタチオンの測定は前述の酵素リサイクリング法によった。

【0083】(サンプル調製)PBSにて洗浄した細胞のペレットに、冷やした5mMEDTAを含む0.1Mリン酸バッファー、pH7.5により調製したTritonX-100を100 $\mu$ l添加し、5分間室温に放置して細胞を溶解した。0.1MのHClを15 $\mu$ l添加し、更に50% sulfosalicylic acid(SSA)溶液を15 $\mu$ l添加して混合後、12,000rpmで5分間遠心して上清を採取し[\*]、総

グルタチオン濃度(GSH+GSSG)の測定サンプルとした。

【0084】(測定法)0.5mMEDTAを含む10mMリン酸バッファー、pH7.5を590 $\mu$ l、6u/mlの濃度に同バッファーで調製したグルタチオンリダクターゼ(バーリンガー・マンハイム社製)を100 $\mu$ l、5%NaHCO<sub>3</sub>にて調製した4mMのNADPH(シグマ社製)を50 $\mu$ l、サンプルを10 $\mu$ l加えて、37℃にて5分間インキュベートし、5mMEDTAを含む0.1Mリン酸バッファー、pH7.5により調製した10mMの5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB;シグマ社製)溶液を50 $\mu$ l加えて、37℃における412nmの吸光度の経時的変化を分光光度計により測定した。尚、標準サンプルとして、GSH(シグマ社製)をサンプルと同じ調製法で調製して用いた。別途、酸化型グルタチオン(GSSG)量のみを測定し—上記\*印の後に、2 $\mu$ lの2-ビニルピリジン(東京化成社製)を添加し、室温で1分間混和しpHを7.5に調製後、室温に60分間放置し、測定サンプルとし、同様に測定する—総グルタチオン量より差し引くことで還元型グルタチオン(GSH)量を求めた。

【0085】(結果)患者の末梢血中の還元型と酸化型グルタチオンの量はGSSG 5.29 $\mu$ M、GSH 20.45 $\mu$ Mと還元型GSHが還元型が約80%で、依然として優位であるが(健康人においては90%以上が還元型GSHである)、胸腔内マクロファージでは還元型GSHが1.45 $\mu$ Mであり、酸化型GSSGが15.85 $\mu$ Mと酸化型が約86%とその存在比が完全に逆転することが判明した。NAC添加群においては、還元型GSHが20.45 $\mu$ Mであり、酸化型GSSGが4.32 $\mu$ Mと酸化型が急激に減少し、還元型の比率が80%を超え、末梢血レベルに回復した。このことは、本疾患において酸化型マクロファージが病態形成に大きな位置を占めること、その病態がNAC投与で改善できることを示し、本発明の効果は単に病態動物に留まらず、糖尿病患者やそのハイリスクの人においても有用であることを示唆するものである。

#### 【0086】(実施例6)

<還元型、酸化型マクロファージからのIL-12産生の差異>T細胞の分化過程、選択過程、機能発現過程に異常があると、生体の免疫系が破綻することから、免疫系の中心的役割は、T細胞により担われていると考えられる。T細胞の亜集団の一つであるヘルパーT細胞(Th)は、リンホカインを産生することにより、免疫担当細胞や炎症性細胞を制御している細胞であるが、最近、Thは、産生するリンホカインの種類により、更にTh1とTh2の2種類に分けられ、それぞれが異なった免疫機能を担っているという考えが提唱されている(J. IMMUNOL., VOL. 136, PP 2348, 1986)。即ち、Th1

は、IL-2やIFN $\gamma$ を産生し、細胞性免疫の調節の主体であり、Th2はIL-4、IL-5、IL-6やIL-10を産生し、液性免疫の調節の主体であり、生体内の免疫調節の恒常性は、Th1とTh2のバランスにより保たれているとする考えである。通常は、Th1/Th2バランスがどちらかに傾くと、それを是正することにより恒常性が維持されるが、何らかの原因によりバランスが是正されない状態が持続すると免疫病が発症すると考えられている。Th1とTh2は、Th0という段階からそれぞれに分化するが、Th0からTh1への分化にはM $\phi$ の産生するIL-12が重要であり(IMMUNOLOGY TODAY, VOL.335, PP 14, 1993)、Th0からTh2への分化にはNKT細胞が産生するIL-4が重要である(J. EXP. MEDICINE, VOL.179, PP 1285, 1994)。

【0087】M $\phi$ のレドックス状態の相違によりM $\phi$ 機能が異なることは前出の各実施例より明らかである。M $\phi$ には、GSH量の相違から酸化型M $\phi$ と還元型M $\phi$ の2種類のM $\phi$ が存在し、NOやIL-6産生パターンが異なる。Th0からTh1への分化を誘導し、Th1/Th2バランス制御の鍵の分子であるIL-12の主な産生細胞はM $\phi$ と考えられるが、その詳細な解析はこれまで報告されていない。IL-12の産生は、酸化型M $\phi$ と還元型M $\phi$ で異なるのか否かは、免疫病の発症メカニズムの観点からも興味深い点である。本発明者等は、IL-12が還元型M $\phi$ からのみ産生することを見出すとともに、IL-12と同じくTh1/Th2バランス制御を行っていると考えられているIL-4が、酸化型M $\phi$ 、還元型M $\phi$ に作用し、Th2側へシフトさせていることを見出した。本発明の完成に先立って得られたこれらの知見を基に、M $\phi$ のレドックス状態が、Th1/Th2バランスを制御していることを示し、本発明を使用する上で免疫系疾患の病態診断に如何に有用かを説明する。

【0088】(IL-12は還元型M $\phi$ から産生される)実施例1において、レンチナン(LNT)を腹腔内注射して調製したM $\phi$ は、GSH量の高い還元型であり、LPSを腹腔内注射して調製したM $\phi$ は、GSH量の低い酸化型であることを示した。LNT誘導M $\phi$ とLPS誘導M $\phi$ において、IL-12産生能が異なるか否かを検討した。LPSとIFN $\gamma$ の刺激により、LNT誘導M $\phi$ では著明なIL-12産生(1312pg/ml)がみられたが、LPS誘導M $\phi$ 及び対照のレジデントM $\phi$ では産生がみられなかった(図4)。次に、細胞内GSH量を変化させる物質を腹腔内注射して調製したM $\phi$ を用いて同様の解析を行った。細胞内GSH量を増加させる物質であるグルタチオンモノエチルエステル(GSH-OEt)、低下させる物質であるマレイン酸ジエチルエステル(DEM)をそれぞれ投与し調製したM $\phi$ では、GSH-OEt投与マウス由来M $\phi$ でのみ、

LPSとIFN $\gamma$ 刺激によりIL-12が産生された(3570pg/ml)。これらの結果は、細胞内のGSH量の多い還元型M $\phi$ でのみ、IL-12が産生されることを示す。

【0089】(還元型M $\phi$ からのIL-12産生は、細胞内GSH量を低下させることにより抑制される)細胞内のGSH量の多い還元型M $\phi$ でのみ、IL-12が産生されることを示したが、この産生は、M $\phi$ を酸化型にすることにより抑制されるか否かを検討した。即ち、レンチナン誘導M $\phi$ を、DEM刺激することにより、IL-12の産生が抑制されるかを解析した。その結果、レンチナン誘導M $\phi$ からのIL-12産生(828pg/ml)は、DEMを添加することにより、完全に抑制される(0pg/ml)ことが明らかとなった。即ち、DEM処理により細胞内の還元型グルタチオンを枯渇させ、還元型M $\phi$ を酸化型M $\phi$ へと変換することにより、IL-12産生は抑制されることが示唆された。

【0090】(IL-4は、還元型M $\phi$ からのIL-12産生を抑制する)IL-4は、M $\phi$ に作用し、抑制的に働くと考えられているサイトカインである。IL-4は、Th1/Th2バランスの制御においても、IL-12と相対する作用を有していると考えられている。そこで、IL-4が、還元型M $\phi$ からのIL-12産生に対し、抑制的に作用するか否かを検討した。LNT誘導M $\phi$ からのIL-12産生及びGSH投与マウス由来M $\phi$ からのIL-12産生とともに、IL-4で前処理することによりは著明に抑制することが明らかとなった(各々1580pg/mlより370pg/mlへ、490pg/mlより258pg/mlへ)。即ち、IL-4はM $\phi$ に作用し、IL-12産生を抑制することにより、Th1/Th2バランスをTh2側にシフトしている可能性が示唆された。この際、IL-4はM $\phi$ 中の還元型グルタチオン量を著明に減少させることがACASによる画像解析で判明した。

【0091】(IL-4は、NO産生を抑制し、IL-6産生を亢進する)還元型M $\phi$ は、酸化型M $\phi$ に比較してIFN $\gamma$ 刺激でのNO産生が亢進し、逆にIL-6産生は抑制される。IFN $\gamma$ は、Th1細胞から産生されるサイトカインとして知られており、IL-4がIFN $\gamma$ によるNO産生及びIL-6産生に対し、どのような作用を示すか、それぞれのM $\phi$ を用いて解析した。IL-4で前処理したM $\phi$ (レジデント、LPS誘導、LNT誘導)にIFN $\gamma$ を作用させ、NO産生量を測定したところ、IL-4で処理していないM $\phi$ に比較して、IL-4処理したM $\phi$ からのNO産生は有意に抑制された。また、GSH-OEt刺激により細胞内GSH量を増加させたM $\phi$ 及びDEM刺激により細胞内GSH量を低下させたM $\phi$ をIL-4で前処理後、IFN $\gamma$ とLPSを作用させてNO産生量を測定したところ、IL-4未処理に比較して、著明にNO産生が抑制された。



【0092】一方、IL-6産生は、レジデントMφ、LPS誘導Mφ、LNT誘導Mφ何れともIL-4により前処理することにより、IFN $\gamma$ での産生が著しく亢進した。更に、GSH-OE刺激により細胞内GSH量を増加させたMφ及びDEM刺激により細胞内GSH量を低下させたMφをIL-4で前処理後、IFN $\gamma$ を作用させてIL-6産生量を測定したところ、IL-4未処理に比較して、著明にIL-6産生が亢進された。これらの結果より、IL-4は、細胞内還元型グルタチオン量を減少させることにより、酸化型マクロファージを誘導し、IFN $\gamma$ 刺激によるNO産生を抑制し、IL-6産生を亢進することが明らかとなった。このことは、IL-4はIFN $\gamma$ の作用、即ちTh1型の作用と考えられるNO産生を抑制し、本来IFN $\gamma$ は弱い作用であったIL-6産生誘導を亢進させ、Th2型の作用を増強させる活性を有していることを示すものである。本知見は本発明になる抗糖尿病剤の有用性を科学的に証明するものである。

#### 【0093】(実施例7)

<経口摂取NACとIL-2の併用によるIL-12産生の増強>DBA/2♀の8週令のマウスに実施例6同様の方法で水道水を自由飲水させる群とNAC1mg/ml濃度の水道水を自由飲水させる2群を作り、更に各々の群にヒトリコンビナントIL-2:2 $\mu$ g/0.5ml/hを1日2回隔日に2週間腹腔内投与を併用する群を設定した。14日目に実施例6同様にMφからのIL-12産生量を検定した。

【0094】(調製したMφのGSH濃度の測定)それぞれの処置を受けたマウスの腹腔細胞を調製し、MCB試薬を用いたACASにより、細胞内GSH量を解析した。対照のマウス(水道水自由飲水群)に比べ、NAC溶解水道水自由飲水群及びIL-2投与群において、還元型グルタチオンの量は著明に増加し、還元型Mφの画像を示した。NAC溶解水道水自由飲水にIL-2投与を併用する群においては何れの単独群よりも還元型グルタチオンの量は更に増加し、還元型Mφの誘導における併用効果がACAS画像解析で明瞭に認められた。併用群では、全てのMφ中に還元型グルタチオンの量の増加が認められた(単独処置群の増量が40-50%のMφに認められることと対照的である)。

【0095】(各群より調製したMφの機能)4群、それぞれのマウスより腹腔細胞を調製し、LPS+IFN $\gamma$ により刺激し、NO産生、IL-6産生、及びIL-12産生能を測定した。単独投与、併用群の3群何れも対照群に対して還元型マクロファージが増量しているため、上記マクロファージ培養上清中のIL-6量が減少した(対照マウスの1240pg/mlに対して、NAC溶解水道水自由飲水群320pg/ml、IL-2投与群520pg/ml、NAC溶解水道水自由飲水にIL-2投与を併用する群67pg/ml)。IL-6が

Th2を誘導する主たるサイトカインであること考えると、これらのNAC経口摂取にIL-2なるサイトカインの注射による併用で生体のTh1/Th2バランスがより強力に制御できることを明確に示す。NO産生の増強パターンはIL-6産生と逆相関した。IL-12産生については、対照マウスの0pg/mlに対して、NAC溶解水道水自由飲水群620pg/ml、IL-2投与群946pg/ml、NAC溶解水道水自由飲水にIL-2投与を併用する群2386pg/mlと著明な併用効果が認められた。本発明が、サイトカイン類との併用で、免疫系疾患としての糖尿病の著しい病態改善に有益な抗糖尿病剤として独創的で、有意義であることを示す。

#### 【0096】(実施例8)

<(NAC-OMe)<sub>2</sub> 投与による酸化型マクロファージの誘導>酸化型マクロファージは(NAC-OMe)<sub>2</sub>20 $\mu$ g/0.5ml/h、若しくはアセチルグリオトキシシン10 $\mu$ g/0.5ml/hをd1、d2にマウス腹腔内に投与して誘導されること、還元型マクロファージはNAC2mg/0.5ml/hを同じく腹腔内にd1、d2投与することにより誘導されていることが、投与終了後20時間後に腹腔浸出細胞を採取し、プラスチック表面に付着させた後、モノクロロバイメイン10 $\mu$ Mと37℃、30分間反応させ、ACASで解析することで判明した。酸化型の増量はモノクロロバイメインとの反応産物が殆ど認められないこと、即ちネズミ色や青色の画像になること、還元型の増量は赤色や黄色の画像が得られることから肉眼的に容易に検定できる。免疫抑制作用のよく知られるステロイド剤の代表であるデキサメサゾン40 $\mu$ g/0.1ml/hをマウス背部皮下にd1、d2に投与して20時間後に誘導されるマクロファージは殆どネズミ色の画像になること、即ち酸化型マクロファージが強力に誘導されることが判明した。一方、N-アセチルシステイン(NAC)2mg投与後20時間目の腹腔浸出細胞を採取して同様に検定したところ赤色や黄色の画像が得られ還元型マクロファージが誘導されることが確認された。同様に酸化型マクロファージの誘導されることは、シスチン誘導体である、N、N'-ジアセチルシスチンニトロキシブチルエステル、N、N'-ジアセチルシスチンジメチルエステル((NAC-OMe)<sub>2</sub>)、N、N'-ジアセチルシスチンジイソプロピルエステル((NAC-OiPr)<sub>2</sub>)、N、N'-ジ-L-アラニルシスチンジメチルエステル((NAlaC-OMe)<sub>2</sub>)の腹腔内投与(各々20 $\mu$ g/0.5ml/h、週2回3週間投与、週令9-11)でもACASにより確認された。

【0097】<(NAC-OMe)<sub>2</sub>、アセチルグリオトキシシン投与によって誘導されたマクロファージからのNO、IL-6産生>そこで、腹腔浸出付着細胞を以下のように培養し、培養上清に産生されるNO、IL-12を測定した。IL-6産生量は刺激剤不在下の自発産生量を測定した。



## 【0098】(1) 材料

細胞：上記のように刺激して得られた腹腔浸出付着細胞  
即ちマクロファージを96穴マイクロプレートに1X1  
0<sup>5</sup>細胞/200μl宛添加

培地：フェノールレッドフリーのRPMI1640 200μl  
/穴

LPS：リボポリサッカライド（シグマ社製）（由来：  
E.coli）100ng/ml

IFN $\gamma$ ：100単位/ml

## 【0099】(2) 測定方法

（腹腔M $\phi$ の採取）腹腔細胞の採取は、エーテルにより  
犠牲死させたマウスの腹腔内に、氷冷した5mlのフェ  
ノールレッドフリーのDMEM培地（日研生物社製）を  
22ゲージの針を付けた注射筒により注入し、しごいた

後、培地を抜き取ることにより行った。

【0100】（IL-6の定量）実施例2の場合と同様  
に定量した。

【0101】（NO<sub>2</sub>-濃度の測定）実施例2の場合と同様  
に測定した。

【0102】（ACASによる細胞内GSHの検出）実施  
例2の場合と同様に検出した。

【0103】（IL-12の定量）実施例2の場合と同様  
に定量した。

【0104】（結果）マクロファージからのNO、IL  
-6、IL-12産生の抑制効果についての結果を表1  
に示す。

【0105】

【表1】

試 料	(対照群産生量%)		
	NO 産生	IL-6 産生	IL-12 産生
(NAC-OMe) <sub>2</sub>	12	320	11
アセチルグリオト キシム	22	450	14
NAC	172	42	920
デキサメサゾン	45	1020	5

【0106】表1から明らかなように、(NAC-OMe)<sub>2</sub>、ア  
セチルグリオトキシム投与により誘導された酸化型マク  
ロファージでは、産生される炎症性サイトカインIL-  
6、NO、IL-12の産生量が変動することが明らか  
である。即ち、薬剤投与で得られた酸化型マクロファ  
ージではIL-6の産生は増強され、臓器障害性に働くN  
O産生も細胞性免疫を増強するIL-12産生も低下す  
る。この効果は典型的免疫抑制剤であるステロイドのデ  
キサメサゾンより強いが同等である。これと対照的にN  
-アセチルシステイン (NAC) により誘導される還元型  
マクロファージからはNOの産生、IL-12の産生が  
上昇し、IL-6産生は抑制される。

## 【0107】(実施例9)

<卵白アルブミン抗原に対する遅延型過敏症反応の抑制  
効果>(NAC-OMe)<sub>2</sub>、(NAC)<sub>2</sub>20μg/0.5ml/h、NAC、

デキサメサゾンを実施例8と同様にd1からd5まで連日  
投与、抗原として卵白アルブミンとコンプリートH37R  
aアジュバント(DIFCO)1:1懸濁液100μl(含む2  
50μg卵白アルブミン)を感作抗原としてd2に背部皮  
下に投与、惹起抗原としてd8に左耳に皮下投与し24  
時間の左耳の腫脹厚を右耳と比較した。

【0108】卵白アルブミン抗原に対する遅延型過敏症  
反応の抑制効果についての結果は表2に示す通りであ  
り、(NAC-OMe)<sub>2</sub>、(NAC)<sub>2</sub>投与によって卵白アルブミン抗  
原に対する遅延型過敏症反応は著明に抑制された。この  
ことはこれらの物質の投与により細胞性免疫が抑制され  
たことを示す。

【0109】

【表2】

試 料	耳厚の増分(mm)
対照群	15.1
(NAC-OMe) <sub>2</sub>	9.75
(NAC) <sub>2</sub>	9.88
NAC	16.5
デキサメサゾン	4.75

## 【0110】(実施例10)

<3-6週令のマクロファージが酸化状態にあり炎症性  
細胞の脾臓浸潤の起こる時期のNODマウスへの薬剤投

与効果>日本クレアより購入したNODマウスを自家繁殖  
させインスリン依存性糖尿病を高率に自然発症するNOD  
マウスコロニーを樹立し、本コロニーから得られた雄の

NODマウスを実験に供した。週令3週令から6週令まで、週に3回、合計9回にわたり、薬剤を経口、若しくは腹腔内投与し糖尿病発症を尿糖の陽性、陰性で週に1回追跡した。尿糖の判定にはウロペーパー（山之内製薬

製BMテストグルコース5000）を用いた。結果を表3に示す。

【0111】

【表3】

薬剤	糖尿病発症率 (%) (イ)	糖尿病発症率 (%) (ロ)
生理食塩水	50	80
(NACOMe) <sub>2</sub>	70	80
(NAC) <sub>2</sub>	60	80
NAC経口	30	40
NAC腹腔内	10	20
レンチナン	10	20
GSHOEt	0	5

(イ) 18週令目、(ロ) 22週令目、特記の無いものは腹腔内投与

【0112】以上の結果は、3-6週令のマクロファージが酸化状態にあり炎症性細胞の脾臓浸潤の起こる時期のNODマウスでは還元型マクロファージを誘導するγ-グルタミルシステイン、γ-グルタミルシステインジメチルエステル、N-アセチルシステインニトロキシブチルエステル等のグルタチオンの前駆体、グルタチオンモノエステル、グルタチオンニトロキシブチルエステル及びグルタチオンジエステル等のグルタチオン誘導體、レンチナン等のβ(1-3)グルカンの投与により糖尿病自然発症の抑制されることを明白に示す薬効実験の結果である。一回投与量については、(NAC)<sub>2</sub>、(NACOMe)<sub>2</sub>は20μg/匹、NAC、GSHOEtは2mg/匹、レンチナンは0.1mg/kgである。

【0113】(実施例11)

<3-6週令のマクロファージが酸化状態にあり炎症性細胞の脾臓浸潤の起こる時期及び9-11週令のNODマウスへの薬剤投与効果>日本クレアより購入したNODマウスを自家繁殖させインスリン依存性糖尿病を高率に自然発症するNODマウスコロニーを樹立し、本コロニーから得られた雌のNODマウスを実験に供した。週令3週令から6週令まで、週に3回、週令9週令から11週令まで週に2回合計15回にわたり、薬剤を経口、若しくは腹腔内投与し糖尿病発症を尿糖の陽性、陰性で週に1回追跡した。尿糖の判定にはウロペーパー（山之内製薬製BMテストグルコース5000）を用いた。結果を表4に示す。

【0114】

【表4】

薬剤	糖尿病発症率 (%)
生理食塩水	60
(NACOMe) <sub>2</sub> 腹腔内(20μg/h)	70
NAC経口(2mg/h)	40
γ-グルタミルシステインジメチルエステル腹腔内(1mg/h)	10
γ-グルタミルシステインジメチルエステル経口(1mg/h)	20
グルタチオンモノエステル 腹腔内(1mg/h)	0
グルタチオンジエステル 腹腔内(1mg/h)	0
レンチナン(0.1mg/kg)	0
グルタチオンジエステル 経口(5mg/h)	0

22週令目に判定を行った。

【0115】以上の結果は、3-6週令のマクロファージが酸化状態にあり炎症性細胞の脾臓浸潤の起こる時期並びに9-11週令における還元型マクロファージの誘導される時期の双方にわたる投与では還元型マクロファージを誘導するγ-グルタミルシステイン、γ-グルタ

ミルシステインジメチルエステル、N-アセチルシステインニトロキシブチルエステル等のグルタチオンの前駆体、グルタチオンモノエステル、グルタチオンニトロキシブチルエステル及びグルタチオンジエステル等のグルタチオン誘導體、レンチナン等のβ(1-3)グルカンの投与により、脾臓への炎症性細胞の浸潤が抑制された

結果、膵島炎や糖尿病の自然発症が抑制されることを明白に示す薬効実験の結果である。

#### 【0116】(実施例12)

<9-11週令のマクロファージが還元状態にあるNODマウスへの薬剤投与効果>日本クレアより購入したNODマウスを自家繁殖させインスリン依存性糖尿病を高率に自然発症するNODマウスコロニーを樹立し、本コロニーから得られた雌のNODマウスを実験に供した。週令9週

令から11週令まで、週に3回、合計9回にわたり、薬剤を経口、若しくは腹腔内投与し、糖尿病発症を尿糖の陽性、陰性で週に1回追跡した。尿糖の判定にはウロペーパー(山之内製薬製BMテストグルコース5000)を用いた。結果を表5に示す。

#### 【0117】

#### 【表5】

薬剤	糖尿病発症率 (%)
生理食塩水	67
(NAC-OMe) <sub>2</sub> 腹腔内	11
(NAIaC-OMe) <sub>2</sub>	11
(NAC) <sub>2</sub>	60
NAC経口	60
γ-グルタミルシステインジメチルエステル 腹腔内	55
グルタチオンジメチルエステル 腹腔内	67
レンチナン	50

22週令目に判定、投与量については実施例11と同様である。

【0118】以上の結果は、9-11週令のマクロファージが還元状態にあるNODマウスへの薬剤投与においては、N, N'-ジアセチルシスチン((NAC)<sub>2</sub>)、N, N'-ジプロピルシスチン((NPC)<sub>2</sub>)、N, N'-ジアセチルシスチンジメチルエステル((NAC-OMe)<sub>2</sub>)、N, N'-ジアセチルシスチンジイソプロピルエステル((NAC-OiPr)<sub>2</sub>)、N, N'-ジ-*l*-アラニルシスチンジメチルエステル((NAIaC-OMe)<sub>2</sub>)、これらのニトロキシブチルエステル体等、前記構造式(1)に示され、マクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を減少させ、遅延型過敏症反応を抑制し、IFNγ、IL-12産生

を抑制する作用を有する化合物に薬効が認められるという事実を明白に示す。

#### 【0119】(実施例13)

<db/dbマウスにおける薬剤効果>日本クレアより購入したdb/dbマウスを自家繁殖させインスリン非依存性糖尿病を高率に自然発症するdb/dbマウスコロニーを樹立し、本コロニーから得られた雄のdb/dbマウスを実験に供した。週令4週令から9週令まで、週に3回、合計18回にわたり、薬剤を腹腔内投与し、インスリン非依存性糖尿病の病態改善効果を飽食時血糖にて週に1回追跡した。結果を表6に示す。

#### 【0120】

#### 【表6】

薬剤	血糖値の相対的割合 (%)		
	6週令	7週令	8週令
生理食塩水	100	100	100
(NAC-OMe) <sub>2</sub>	94	92	93
(NAC) <sub>2</sub>	95	100	98
γ-グルタミルシステインジメチルエステル	85	65	60
グルタチオンジメチルエステル	82	62	60
レンチナン+グルタチオンジメチルエステル	70	55	50

投与量は実施例11と同様である。

【0121】以上の結果は、インスリン非依存性糖尿病を高率に自然発症するdb/dbマウスへの投与では還元型マクロファージを誘導するγ-グルタミルシステイン、γ-グルタミルシステインジメチルエステル、N-アセチルシステインニトロキシブチルエステル等のグル

タチオンの前駆体、グルタチオンモノエステル、グルタチオンニトロキシブチルエステル及びグルタチオンジエステル等のグルタチオン誘導体、レンチナン等のβ(1-3)グルカンの投与により、血糖値の低下が有意にもたらされ、これらの物質がグルコースの筋肉、脂肪細胞への取り込み不全によるインスリン非依存性の糖尿病に

対しても病態改善効果を有することを明白に示す薬効実験の結果である。その作用機作は不明であるが、肝機能の改善若しくはホスファターゼに対する阻害作用等が薬理効果の因と推定される。

#### 【0122】

【発明の効果】本発明の抗糖尿病剤により、マクロファージ（単球、クッパー細胞及び樹状細胞等を含む。）の機能の斬新な制御が可能となり、特にヒトのインスリン依存性糖尿病、インスリン非依存性糖尿病、同疾患に随伴する合併症、同疾患のハイリスク状態の治療、病態改善、予防を可能とする。特に、経口摂取することができ、医薬品や、飲食品、栄養剤及び輸液製剤の形態としても使用可能である。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、想定される、マクロファージの機能の相違並びにTh1及びTh2による免疫抑制、悪液質状態、癌細胞の悪性化誘導の機序、局所炎症等との関係の

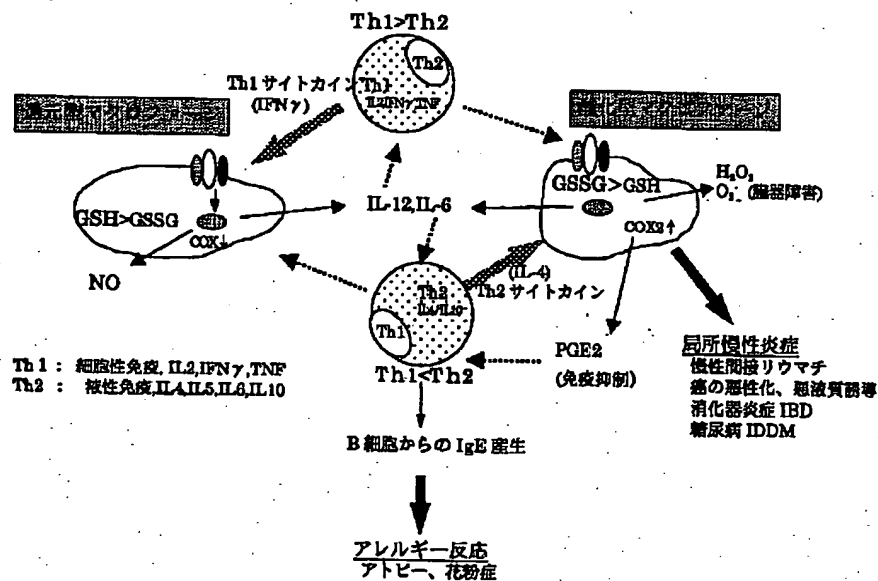
仮説模式図を示す。

【図2】図2は、酸化型、還元型マクロファージの存在比がTh1型、Th2型サイトカインの選択的な産生制御を介して免疫機能を制御していることを説明したものである。本発明者等の新しい知見に基づくものであり、マクロファージの酸化還元状態がin vivoにおける免疫能の傾きを増幅する要になっていることを示す。

【図3】図3は、実施例1における両マクロファージの機能の検定の結果を表す図で、酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージにおける機能の差を示したグラフである。

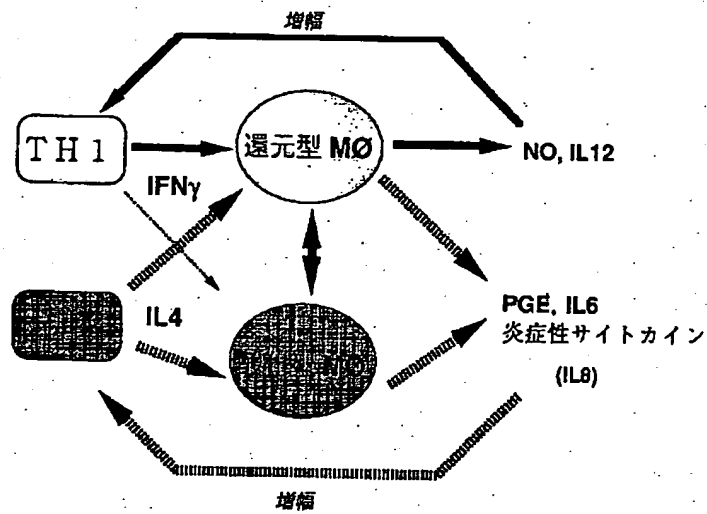
【図4】図4は、LNT誘導MφとLPS誘導Mφにおいて、IL-12産生能が異なるか否かを検討した結果を表す図で、酸化型、還元型マクロファージによってTh1サイトカインであるIL-12の産生量が全く異なり、IL-12は還元型グルタチオン含量の高い還元型マクロファージからのみ産生されることを示す。

【図1】



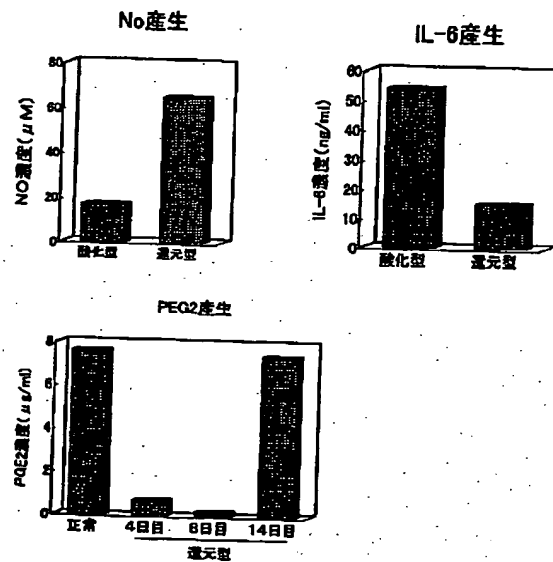
【図2】

TH1/TH2 バランス と  
還元/酸化型マクロファージ(Mφ)

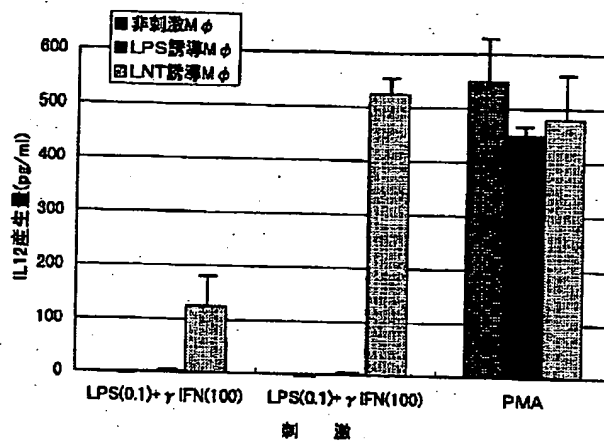


【図3】

酸化型/還元型マクロファージの機能



【図4】



PMA: ホルボールエステル  
 LPS: リポポリサッカライド (ng/ml)  
 IFN: インターフェロンγ (U/ml)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

A 6 1 K 31/00  
 31/22  
 31/235

識別記号

6 4 3

F I

A 6 1 K 31/00  
 31/22  
 31/235

ターコード (参考)

6 4 3 D

F ターム (参考) 4B018 MD07 ME03

4C076 AA12 BB01 BB17 CC03 CC21  
 DD70 EE41

4C084 AA17 BA01 BA08 BA14 BA15  
 BA26 BA27 BA31 DA01 MA01  
 MA02 NA14 ZC352

4C206 AA01 AA02 JA58 JA62 MA01  
 MA02 MA04 MA13 NA14 ZB08  
 ZC35